

## STREPTOCOCCUS PYOGENES SUŞLARINDA MAKROLİD DİRENÇ MEKANİZMALARI VE ORANLARI (AYDIN)

Murat TELLİ, Mete EYİĞÖR, Yasin TİRYAKİ, Neriman AYDIN

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, AYDIN

### ÖZET

*Streptococcus pyogenes* bakteriyel farenjitin en sık nedenidir. Makrolidler, beta-laktam alerjisi olanlarda ve penisiline tedavide başarısız olanlarda sıklıkla penisilin yerine önerilmektedir. Çalışmamızda, *Streptococcus pyogenes* izolatlarında, makrolid direnç oranlarını ve direnç mekanizmalarını belirlemek amaçlanmıştır.

Ocak 2007 ve Mayıs 2010 tarihleri arasında çeşitli klinik örneklerden (59 boğaz, 19 yara, 3 kan ve 4 diğer) toplam 85 *S.pyogenes* suşu elde edilmiştir. Suşların eritromisin, klindamisin, penisiline minimal inhibitör konsantrasyonları mikrodilüsyon yöntemi ile, tetrasiklin, vankomisin, seftriakson, levofloksasine duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ile CLSI kurallarına göre test edilmiştir. Makrolid direnç fenotipleri için "çift disk testi" uygulanmıştır. Makrolid direnç genleri ise (*ermA*, *ermB*, *ermC*, *ermTR* ve *mefA*) polimeraz zincir reaksiyonu ile araştırılmıştır. Eritromisin, tetrasiklin ve levofloksasine direnç sırasıyla % 15, % 19, % 1 oranında bulunmuştur. Eritromisine dirençli suşlardan 7 (% 54) tanesi iMLS<sub>B</sub>, 6 (% 46) tanesi M (efluks) fenotipinde bulunmuştur. iMLS<sub>B</sub> fenotipindeki suşların hepsinde *ermTR* direnç geni, M fenotipindeki suşların hepsinde ise *mefA* direnç geni bulunmuştur. Test ettiğimiz *S.pyogenes* suşlarında makrolidlere direnç oranı ve iMLS<sub>B</sub> direnç mekanizması ülkemizden bildirilen önceki oranlara göre yüksek bulunmuştur. Çalışmamız sonucunda makrolid dirençli *S.pyogenes* suşlarının takibinin yapılması ve epidemiyolojik verilerinin oluşturulması gerekliliği düşünülmüştür.

**Anahtar sözcükler:** direnç, fenotip, makrolidler, *Streptococcus pyogenes*

### SUMMARY

#### Macrolide Resistance Mechanism and Ratio in *Streptococcus pyogenes* Strains in Aydın, Turkey

*Streptococcus pyogenes* is the most common cause of bacterial pharyngitis. Macrolides are often recommended substitutes for patients hypersensitive to beta-lactam antibiotics and in whom therapy with these drugs fails. The aim of this study was to detect macrolide resistance types and their respective ratios in clinical isolates of *S.pyogenes*.

Between January 2007 and May 2010, 85 *S.pyogenes* isolates were obtained from samples of the throat (n=59), wounds (n=19), blood (n=3), and other sites (n=5) of patients. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of erythromycin, clindamycin and penicillin against the isolates were determined by the microdilution method. The susceptibility of the isolates to tetracycline, vancomycin, ceftriaxone and levofloxacin was tested by the disc diffusion method. All susceptibility tests were performed and interpreted according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines. Macrolide resistance phenotypes were identified in a double-disc test, and macrolide resistance genes (*ermA*, *ermB*, *ermC*, *ermTR* ve *mefA*) were investigated by polymerase chain reaction (PCR). Strains resistant to erythromycin, tetracycline and levofloxacin accounted for 15 %, 19 % and 1 % of the isolates, respectively. Among erythromycin-resistant *S.pyogenes* strains, 7 (54 %) were of the iMLS<sub>B</sub> phenotype and 6 (46 %) were of the M (efflux) phenotype. All iMLS<sub>B</sub> phenotype strains carried the *ermTR* resistance gene and all M phenotype strains carried the *mefA* gene. Our erythromycin resistance and iMLS<sub>B</sub> resistance mechanism rates were higher compared to other reports in Turkey. Thus, continuous monitoring of macrolide-resistant *S.pyogenes* strains is needed as the basis for epidemiological studies.

**Keywords:** macrolides, phenotype, resistance, *Streptococcus pyogenes*

## GİRİŞ

*Streptococcus pyogenes* insanlar için en önemli bakteriyel patojenlerden biridir. *S.pyogenes* sıklıkla akut farenjite neden olmakla birlikte deri ve sistemik infeksiyonlara da neden olmaktadır<sup>(8)</sup>. *S.pyogenes* infeksiyonlarının tedavisinde ilk tercih edilen antibiyotik penisilinlerdir. Ancak penisilin alerjisi olanlarda makrolidler ve linkozamidler tercih edilen antibiyotikler olur. Bu ajanların yaygın kullanımı nedeniyle birçok ülkede ve ülkemizde artan direnç oranları ortaya çıkmıştır<sup>(2,3,13,15,20)</sup>. Direnç iki mekanizma ile olmaktadır; hedef bölge değişimi ve aktif ilaç atılımı (efluks). Organizmada hedef bölge değişimi metilaz enzimi ile olmakta ve makrolidler, linkozamidler ve streptogramin B antibiyotiklerinin (MLS<sub>B</sub>) bakteri ribozomunda hedef bölgeye bağlanmalarını azaltmaktadır. MLS<sub>B</sub> direnci Gram pozitif koklarda yapısal (cMLS<sub>B</sub> fenotip) veya indüklenebilir (iMLS<sub>B</sub> fenotip) olarak görülmektedir. Bu direnç mekanizması *S.pyogenes*'de *ermB* veya *ermTR* geni tarafından kodlanmaktadır. Aktif ilaç atılımı ise M fenotipi ile ilişkilidir. Bu fenotipte linkozamid ve streptogramin B direnci görülmemektedir. M fenotipinde direnç *mefA* geni tarafından kodlanmaktadır<sup>(30,34)</sup>. Çalışmamızın amacı; *S.pyogenes* izolatlarında makrolid direnç fenotiplerini ve oranlarını araştırmaktır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Suşların tanımlanması ve antibiyotik duyarlılıkları

Ocak 2007 ile Mayıs 2010 tarihleri arasında çeşitli klinik örneklerinden izole edilen 85 *S.pyogenes* suşu çalışmaya alınmıştır. Her hastadan tek bir izolat çalışmaya dahil edilmiştir. Suşların tanımlanmasında; koloni morfolojisi, beta-hemoliz, Gram boyama, katalaz testi, basitrasın duyarlılığı ve lateks aglütinasyon testlerinden faydalanılmıştır. Eritromisin, klindamisin, penisilin minimal inhibitör konsantrasyonları (MİK) mikrodilüsyon yöntemi ile; tetrasiklin, vankomisin, seftriakson, levofloksasin duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ile Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) kriterleri-

ne göre yapılmış ve yorumlanmıştır<sup>(11,12)</sup>. Kalite kontrol suşu olarak *S.pneumoniae* ATCC 49619 ve ATCC 700677 suşları kullanılmıştır.

### Makrolid direnç fenotiplerinin ve genlerinin belirlenmesi

Direnç fenotiplerini belirlemek amacıyla çift disk testi (D test) uygulanmıştır<sup>(10)</sup>. İnkübasyondan sonra, eğer klindamisin zon çapının eritromisin tarafına bakan kısımda düzleşme var ise iMLS<sub>B</sub> direnci, hem eritromisin hem klindamisin direnci mevcut ise cMLS<sub>B</sub> direnci, sadece eritromisine dirençli iken klindamisine duyarlı ise efluks (M) mekanizması olarak değerlendirilmiştir.

Direnç genlerinin araştırılmasında kullanılacak bakteri DNA'nın eldesi için, % 5 koyun kanlı agarda bir gece inkübe edilmiş *S.pyogenes* kolonilerinden birkaç tanesi 300 µl 10 mM Tris HCl (pH:8.5) içeren süspansiyonda 10 dakika 96°C'de kaynatılmıştır<sup>(22)</sup>. Direnç genlerinin araştırılması için kullanılan *ermA*, *ermB*, *ermC*, *ermTR* ve *mefA* spesifik gen dizinleri Tablo 1'de listelenmiştir<sup>(33)</sup>. Hedef DNA'nın çoğaltılması için termal döngü cihazında kullanılan program şöyleydi; 94°C'de 5 dakika (1 döngü), 94°C'de 1 dakika, 50°C'de 1 dakika, 72°C'de 1 dakika (35 döngü) ve 72°C'de 10 dakika (1 döngü).

**Tablo 1.** Direnç genlerini araştırmada kullanılan gen dizinleri.

Hedef gen		Gen dizisi (5'-3')
<i>ermA</i>	P1	TCTAAAAAGCATGTAAAAGAA
	P2	CTTCGATAGTTTATTAATATTAGT
<i>ermB</i>	P1	GAAAAGGTACTIONCAACCAAATA
	P2	AGTAACGGTACTAATATTGTTTAC
<i>ermC</i>	P1	ATTTTCTGTATTCTTTGTT
	P2	TTCTAAAAACCAATCTTAT
<i>mefA</i>	P1	AGTATCATTAATCAGTAGTGC
	P2	TTCTTCTGGTACTAAAAGTGG
<i>ermTR</i>	P1	AGAAGTTATAATGAAACAGAA
	P2	GGCATGACATAAACCTTCAT

## BULGULAR

Çalışmamızda test ettiğimiz 85 *S.pyogenes* suşunun örnekler göre dağılımı şöyleydi; 59 (% 68) boğaz sürüntüsü, 19 (% 23) yara materya-

li, 3 (% 4) kan, 4 (% 5) diğer. Test ettiğimiz suşlarda penisiline, vankomisine, seftriaksona ve klindamisine dirençli suş bulunmamıştır. Eritromisin, tetrasiklin ve levofloksasin direnci sırasıyla; 13 (% 15), 16 (% 19), 1 (% 1) suşta bulunmuştur. Suşların antibiyotik direnç oranları Tablo 2'de gösterilmiştir. Eritromisine dirençli suşlardan 7 (% 54) tanesi iMLS<sub>B</sub>, 6 (% 46) tanesi M (efluks) fenotipinde bulunmuştur. iMLS<sub>B</sub> fenotipindeki suşların hepsinde *ermTR* direnç geni, M fenotipindeki suşların hepsinde *mefA* direnç geni bulunmuştur. Makrolid dirençli suşların 7'si boğaz (% 54), 6'sı yara yeri (% 46) izolatu idi. Direnç genlerine göre örneklerin dağılımı; *ermTR* direnç genine sahip suşlar 6 boğaz, 1 yara yeri; *mefA* direnç genine sahip suşlar 5 yara yeri, 1 boğaz izolatu idi. Direnç genlerine göre eritromisinin MİK<sub>50/90</sub> değerleri *ermTR* ve *mefA* için sırasıyla  $\geq 4/\geq 4$  mg/L ve  $\geq 4/\geq 4$  mg/L olarak bulunmuştur. Eritromisin dirençli suşların fenotipik ve genotipik dağılımı Tablo 3'de özetlenmiştir.

**Tablo 2.** Suşların antibiyotik duyarlılık oranları ve MİK değerleri.

Antibiyotikler	Duyarlı (%)	Dirençli (%)	MİK <sub>50</sub> (mg/L)	MİK <sub>90</sub> (mg/L)
Penisilin	100	0	0.032	0.032
Eritromisin	85	15	$\leq 0.032$	$\geq 4$
Klindamisin	100	0	0.064	0.125
Tetrasiklin	81	19	T.E.	T.E.
Levofloksasin	99	1	T.E.	T.E.
Vankomisin	100	0	T.E.	T.E.
Seftriakson	100	0	T.E.	T.E.

T.E.: Test edilmedi.

**Tablo 3.** Eritromisin dirençli suşların dağılımı.

Direnç genleri/Fenotipler	Suş sayısı (%)	Eritromisin MİK <sub>50/90</sub> (mg/L)
<i>ermTR</i> / iMLS <sub>B</sub>	7 (54)	$\geq 4/\geq 4$
<i>mefA</i> / M	6 (46)	$\geq 4/\geq 4$

## TARTIŞMA

*S.pyogenes* suşlarında makrolidlere direnç tüm dünyada değişik oranlarda bildirilmektedir<sup>(3,4,9,20,24,32,35)</sup>. Çalışmamızda bulduğumuz direnç oranımız (% 15) diğer ülkelerle karşılaştırıldığında, Asya ülkelerine (% 23-95) göre

düşük<sup>(4,24)</sup>, Amerika ülkelerine (% 2.1-6.1) göre yüksek bulunmuştur<sup>(15,20)</sup>. Avrupada ise ülkeler arasında oranlar (% 3-21) farklılık göstermektedir. Kuzey Avrupa ülkelerinde oran daha düşük iken, Güney Avrupa'da daha yüksek oranlar bildirilmektedir<sup>(9,26,28,32,35)</sup>. Ülkemizde yapılan çalışmalarda bildirilen oranlar (% 2-10) ile karşılaştırıldığında, çalışmamızda daha yüksek direnç oranı bulunmuştur<sup>(1,2,5,13,18)</sup>. Bunun sebebinin aşırı makrolid kullanımındaki ve/veya klonal bir yayılım sonucu olabileceği düşünülmüştür. Aksine makrolid direncinde düşüş bildirilen bazı çalışmalar da mevcuttur. Silva-Costa ve ark.<sup>(31)</sup> Portekiz'de zamanla azalan makrolid direnç oranı bildirmişler ve bunu değişen klonlara ve bunların sahip olduğu direnç mekanizmalarına bağlamışlardır. Bu da göstermektedir ki direnç mekanizmalarının ve buna sahip dirençli klonlarının sürekli takibinin yapılması önemlidir.

Makrolid direnç mekanizmalarının dağılımı da dünyada ve ülkemizde farklılık göstermektedir. Kuzey Amerika'da M tipi direnç<sup>(15,17,20)</sup>, Asya ülkelerinde ise MLS<sub>B</sub> tipi direnç daha sık bildirilmektedir<sup>(4,24,36)</sup>. Avrupa ülkelerinde ise direnç tipleri ülkeler arasında, hatta yıllara göre değişmektedir. Almanya ve Belçika'da M tipi hakim iken, Fransa, İspanya ve İngiltere'de MLS<sub>B</sub> direnç tipi hakimdir<sup>(7,10,16,19,29)</sup>. Ülkemizde yapılan çalışmalarda ise M tipi direnci bildiren çalışmalar yanında son yıllarda MLS<sub>B</sub> tipini bildiren çalışmalar da bulunmaktadır<sup>(2,5,13,18)</sup>. Çalışmamızda MLS<sub>B</sub> fenotipi % 54, M fenotipi % 46 oranında bulunmuştur. MLS<sub>B</sub> direnç tipi tüm makrolid ajanlara direnç oluşması açısından önemlidir. Çalışmamızda MLS<sub>B</sub> dirençli suşların hepsinde iMLS<sub>B</sub> mekanizması bulunmuştur ve bu ülkemizde yapılan daha önceki çalışmalarla uyumludur.

Çalışmamızda MLS<sub>B</sub> tip dirence sahip suşların tamamında *ermTR*, M tip dirence sahip suşların tamamında *mefA* direnç geni bulunmuştur. Bu sonuçlar da daha önceki çalışmalar ile benzerlik göstermektedir<sup>(1,13,18,20,21)</sup>.

Çalışmamızda boğaz izolatlarında iMLS<sub>B</sub> (*ermTR*) direnç tipi, yara izolatlarında M (*mefA*) direnç tipi daha yüksek oranda bulunmuştur. Çeşitli ülkelerden yapılan çalışmalarda da infeksiyon yerine göre de direnç tiplerinde farklılık

olduğu bildirilmiştir. Üst solunum yolu izolatlarında İtalya'da MLS<sub>B</sub> tipi direnç, Japonya'da M tipi direnç daha çok bildirilmiştir<sup>(6,14)</sup>. İnvazif izolatların incelendiği İsrail'de bir çalışmada M fenotipi dirençten daha çok sorumlu iken, Çin ve Danimarka'da yapılan çalışmalarda MLS<sub>B</sub> fenotipinde direnç çoğunlukta bulunmuştur<sup>(23,25,27)</sup>. İnfeksiyon tipine ve bölgesine göre suşların makrolid direnç tiplerinin çeşitlilik gösterdiği görülmektedir. Bu nedenle dirençli suşların genotipik olarak incelenmesi klonal bir dağılımın gösterilmesi için önemlidir. Ülkemizde yapılan genotipik çalışmalar sınırlıdır. Dünder ve ark.<sup>(18)</sup> en sık emm 4,1,2,114,89 tiplerini bulmuş ancak makrolid direnci ile infeksiyon bölgesi arasında bir ilişki olmadığını belirtmiştir. Çalışmamızdaki makrolidlere direnç oranlarındaki artışın ve infeksiyon bölgesine göre direnç mekanizmalarının farklılığının, üst solunum yolu infeksiyonlarında makrolidlerin yoğun kullanımı ve buna bağlı dirençli klonların (özellikle iMLS<sub>B</sub> içerenlerin) artışının sorumlu olabileceği düşünülmüştür. Ancak bu hipotezin genotipik (emm tiplere gibi) olarak doğrulanması gereklidir.

Sonuç olarak test ettiğimiz *S.pyogenes* izolatlarında makrolidlere direnç oranı (% 15) ülkemizde yapılan önceki çalışmalara göre yüksek bulunmuştur. En sık direnç mekanizmasının iMLS<sub>B</sub> (% 54) direnci olduğu gösterilmiştir. *S.pyogenes* izolatlarında genotipik çalışmaların önemli olduğu ve klonal bir dağılımın araştırılması gerekliliği düşünülmüştür.

## KAYNAKLAR

1. Acikgoz ZC, Gocer S, Tuncer S. Macrolide resistance determinants of group A streptococci in Ankara, Turkey, *J Antimicrob Chemother* 2003; 52(1):110-2.  
<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkg300>  
PMid:12805256
2. Akata F, Oztürk D, Tansel O et al. Resistance to macrolides in Group A streptococci from the European section of Turkey: genetic and phenotypic characterization, *Int J Antimicrob Agents* 2002; 20(6):461-3.  
[http://dx.doi.org/10.1016/S0924-8579\(02\)00241-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0924-8579(02)00241-8)
3. Ardanuy C, Domenech A, Rolo D et al. Molecular characterization of macrolide- and multidrug-resistant *Streptococcus pyogenes* isolated from adult patients in Barcelona, Spain (1993-2008), *J Antimicrob Chemother* 2010;65(4):634-43.  
<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkq006>  
PMid:20118164
4. Bae SY, Kim JS, Kwon JA et al. Phenotypes and genotypes of macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* isolated in Seoul, Korea, *J Med Microbiol* 2007;56(Pt 2):229-35.  
<http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.46825-0>  
PMid:17244805
5. Bayraktar B, Başarı F, Bulut E. A grubu beta-hemolitik streptokoklarda antibiyotik duyarlılık ve makrolid direnç fenotipi, *ANKEM Derg* 2008;22(3):127-31.
6. Billal DS, Hotomi M, Yamauchi K et al. Macrolide-resistant genes of *Streptococcus pyogenes* isolated from the upper respiratory tract by polymerase chain reaction, *J Infect Chemother* 2004;10(2):115-20.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s10156-004-0302-x>  
PMid:15160306
7. Bingen E, Bidet P, Mihaila-Amrouche L et al. Emergence of macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* strains in French children, *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(9):3559-62.  
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.48.9.3559-3562.2004>  
PMid:15328126 PMCID:514735
8. Binso AL, Stevens DL. *Streptococcus pyogenes*, "Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 6th ed" kitabında s.2362-79, Churchill Livingstone, Philadelphia (2005).
9. Bley C, van der Linden M, Reinert RR. *mef(A)* is the predominant macrolide resistance determinant in *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* in Germany, *Int J Antimicrob Agents* 2011;37(5):425-31.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.01.019>  
PMid:21419605
10. Calatayud L, Ardanuy C, Cercenado E et al. Serotypes, clones, and mechanisms of resistance of erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates collected in Spain, *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51(9):3240-6.  
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00157-07>  
PMid:17606677 PMCID:2043242
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility

- test for bacteria that grow aerobically, 7th ed., Approved standard M7–A6, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (2006).
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 17th informational supplement, CLSI document M100-S17, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (2007).
  13. Colakoglu S, Alacam R, Hascelik G. Prevalence and mechanisms of macrolide resistance in *Streptococcus pyogenes* in Ankara, Turkey, *Scand J Infect Dis* 2006;38(6-7):456-9.  
<http://dx.doi.org/10.1080/00365540500546290>  
PMid:16798693
  14. Creti R, Gherardi G, Imperi M et al. Association of group A streptococcal emm types with virulence traits and macrolide-resistance genes is independent of the source of isolation, *J Med Microbiol* 2005;54(10):913-7.  
<http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.46035-0>  
PMid:16157543
  15. De Azavedo JC, Yeung RH, Bast DJ, Duncan CL, Borgia SB, Low DE. Prevalence and mechanisms of macrolide resistance in clinical isolates of group A streptococci from Ontario, Canada, *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43(9):2144-7.  
PMid:10471555 PMCID:89437
  16. Descheemaeker P, Chapelle S, Lammens C et al. Macrolide resistance and erythromycin resistance determinants among Belgian *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae* isolates, *J Antimicrob Chemother* 2000;45(2):167-73.  
<http://dx.doi.org/10.1093/jac/45.2.167>  
PMid:10660498
  17. Desjardins M, Delgaty KL, Ramotar K, Seetaram C, Toye B. Prevalence and mechanisms of erythromycin resistance in group A and group B *Streptococcus*: implications for reporting susceptibility results, *J Clin Microbiol* 2004;42(12):5620-3.  
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.12.5620-5623.2004>  
PMid:15583291 PMCID:535282
  18. Dundar D, Sayan M, Tamer GS. Macrolide and tetracycline resistance and emm type distribution of *Streptococcus pyogenes* isolates recovered from Turkish patients, *Microb Drug Resist* 2010; 16(4):279-84.  
<http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2010.0021>  
PMid:20624096 PMCID:3124751
  19. Farrell DJ, Morrissey I, Bakker S, Felmingham D. Detection of macrolide resistance mechanisms in *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* using a multiplex rapid cycle PCR with microwell-format probe hybridization, *J Antimicrob Chemother* 2001;48(4):541-4.  
<http://dx.doi.org/10.1093/jac/48.4.541>  
PMid:11581234
  20. Green MD, Beall B, Marcon MJ et al. Multicentre surveillance of the prevalence and molecular epidemiology of macrolide resistance among pharyngeal isolates of group A streptococci in the USA, *J Antimicrob Chemother* 2006;57(6):1240-3.  
<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkl101>  
PMid:16556634
  21. Kataja J, Huovinen P, Skurnik M, Seppälä H and The Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance. Erythromycin resistance genes in group A streptococci in Finland, *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43(1):48-52.  
PMid:9869564 PMCID:89019
  22. Klugman, KP, Capper T, Widdowson CA, Koornhof HJ, Moser W. Increased activity of 16-membered lactone ring macrolides against erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae*: characterization of South African isolates, *J Antimicrob Chemother* 1998;42(6):729-34.  
<http://dx.doi.org/10.1093/jac/42.6.729>  
PMid:10052895
  23. Liang Y, Shen X, Huang G, Wang C, Shen Y, Yang Y. Characteristics of *Streptococcus pyogenes* strains isolated from Chinese children with scarlet fever, *Acta Paediatr* 2008;97(12):1681-5.  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1651-2227.2008.00983.x>  
PMid:18691162
  24. Liu X, Shen X, Chang H et al. High macrolide resistance in *Streptococcus pyogenes* strains isolated from children with pharyngitis in China, *Pediatr Pulmonol* 2009;44(5):436-41.  
<http://dx.doi.org/10.1002/ppul.20976>  
PMid:19360846
  25. Luca-Harari B, Ekelund K, van der Linden M, Staum-Kaltoft M, Hammerum AM, Jasir A. Clinical and epidemiological aspects of invasive *Streptococcus pyogenes* infections in Denmark during 2003 and 2004, *J Clin Microbiol* 2008; 46(1):79-86.  
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01626-07>  
PMid:17959766 PMCID:2224248
  26. Michos AG, Bakoula CG, Braoudaki M et al. Macrolide resistance in *Streptococcus pyogenes*: prevalence, resistance determinants, and emm types, *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009;64(3):295-9.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.03.004>  
PMid:19395219

27. Nir-Paz R, Block C, Shasha D et al. Macrolide, lincosamide and tetracycline susceptibility and emm characterisation of invasive *Streptococcus pyogenes* isolates in Israel, *Int J Antimicrob Agents* 2006;28(4):313-9.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.07.005>  
PMid:16973336
28. Pérez-Trallero E, Montes M, Orden B, Tamayo E, García-Arenzana JM, Marimón JM. Phenotypic and genotypic characterization of *Streptococcus pyogenes* isolates displaying the MLS<sub>B</sub> phenotype of macrolide resistance in Spain, 1999 to 2005, *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51(4):1228-33.  
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01054-06>  
PMid:17242142 PMCID:1855467
29. Reinert RR, Lütticken R, Sutcliffe JA et al. Clonal relatedness of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* isolates in Germany, *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(4):1369-73.  
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.48.4.1369-1373.2004>  
PMid:15047546 PMCID:375310
30. Seppälä H, Skurnik M, Soini H, Roberts MC, Huovinen P. A novel erythromycin resistance methylase gene (ermTR) in *Streptococcus pyogenes*, *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42(2):257-62.  
PMid:9527769 PMCID:105397
31. Silva-Costa C, Pinto FR, Ramirez M, Melo-Cristino J and Portuguese Surveillance Group for the Study of Respiratory Pathogens. Decrease in macrolide resistance and clonal instability among *Streptococcus pyogenes* in Portugal, *Clin Microbiol Infect* 2008;14(12):1152-9.  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02104.x>  
PMid:19046174
32. Silva-Costa C, Ramirez M, Melo-Cristino J. Identification of macrolide-resistant clones of *Streptococcus pyogenes* in Portugal, *Clin Microbiol Infect* 2006;12(6):513-8.  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01408.x>  
PMid:16700698
33. Sutcliffe J, Grebe T, Tait-Kamradt A, Wondrack L. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR, *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40(11):2562-6.  
PMid:8913465 PMCID:163576
34. Sutcliffe J, Tait-Kamradt A, Wondrack L. *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* resistant to macrolides but sensitive to clindamycin: a common resistance pattern mediated by an efflux system, *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40(8):1817-24.  
PMid:8843287 PMCID:163423
35. Szczypa K, Sadowy E, Izdebski R, Hryniewicz W. A rapid increase in macrolide resistance in *Streptococcus pyogenes* isolated in Poland during 1996-2002, *J Antimicrob Chemother* 2004;54(4):828-31.  
<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkh420>  
PMid:15329367
36. Uh Y, Jang IH, Hwang GY, Lee MK, Yoon KJ, Kim HY. Antimicrobial susceptibility patterns and macrolide resistance genes of beta-hemolytic streptococci in Korea, *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(7):2716-8.  
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.48.7.2716-2718.2004>  
PMid:15215133 PMCID:434227